

SUBSTRATE FOR TISSUE REGENERATION, MATERIAL FOR TRANSPLANTATION, AND PROCESSES FOR PRODUCING THESE

Publication number: WO0245767 (A1)
 Publication date: 2002-06-13
 Inventor(s): KUROYANAGI YOSHIMITSU [JP]
 Applicant(s): JAPAN TISSUE ENGINEERING CO. LT. [JP]; KUROYANAGI YOSHIMITSU [JP]
 Classification:
 - International: A61L27/20; A61L27/56; A61L27/00; (IPC1-7): A61L27/44; A61L27/38
 - European: A61L27/20; A61L27/56
 Application number: WO2001JP10751 20011207
 Priority number(s): JP20000373116 20001207

Also published as:

☐ CN1774272 (A)
☐ AU2108902 (A)

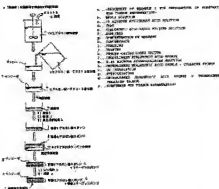
Cited documents:

☐ JP2001212224 (A)
☐ WO9417840 (A1)
☐ EP1022031 (A1)
☐ JP11319066 (A)
☐ JP6292716 (A)

[more >>](#)

Abstract of WO 0245767 (A1)

A 1% aqueous hyaluronic acid solution containing a water-soluble epoxy compound as a crosslinking agent is heated and concentrated to obtain an intermolecularly crosslinked hyaluronic acid. Subsequently, this crosslinked compound is freeze-dried under vacuum to obtain a hyaluronic acid sponge. The sponge is impregnated with an atherocollagen solution and then freeze-dried under vacuum. Thus, a substrate for tissue regeneration is obtained.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年6月13日 (13.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/45767 A1

- (51) 国際特許分類: A61L 27/44, 27/38
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/10751
- (22) 国際出願日: 2001年12月7日 (07.12.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-373116 2000年12月7日 (07.12.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (JAPAN TISSUE ENGINEERING CO., LTD) [JP/JP]; 〒443-0022 愛知県清海市三谷北通6丁目209番地の1 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (73) 発明者/出願人 (日本, 米国についてのみ): 黒柳能光

(KUROYANAGI, Yoshimitsu) [JP/JP]; 〒228-0002 神奈川県座間市小松原1-6-9-701 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 アイテック国際特許事務所 (ITEC INTERNATIONAL PATENT FIRM); 〒460-0008 愛知県名古屋市中区栄二丁目9番26号 ボーラ名古屋ビル内 Aichi (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

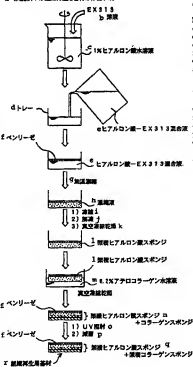
(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

[続表有])

(54) Title: SUBSTRATE FOR TISSUE REGENERATION, MATERIAL FOR TRANSPLANTATION, AND PROCESSES FOR PRODUCING THESE

(54) 発明の名称: 組織再生用基材、移植用材料及びそれらの製法

a. (実施例1)の組織再生用基材の作製手順



a. ...PROCEDURE OF EXAMPLE 1 FOR PREPARATION OF SUBSTRATE FOR TISSUE REGENERATION-

b. ...E333 SOLUTION

c. ...1% AQUEOUS HYALURONIC ACID SOLUTION

d. ...TRAY

e. ...HYALURONIC ACID/E333 MIXTURE SOLUTION

f. ...FREEZING

g. ...CONCENTRATION BY HEATING

h. ...CONCENTRATE

i. ...FREEZING

j. ...TRAY

k. ...FREEZE DRYING UNDER VACUUM

l. ...CROSSLINKED HYALURONIC ACID SPONGE

m. ...0.2% AQUEOUS AHTHEROCOLLAGEN SOLUTION

n. ...CROSSLINKED HYALURONIC ACID SPONGE + COLLAGEN SPONGE

o. ...UV IRRADIATION

p. ...OVERLAPPING

q. ...CROSSLINKED HYALURONIC ACID SPONGE + CROSSLINKED COLLAGEN SPONGE

r. ...SUBSTRATE FOR TISSUE REGENERATION

(57) Abstract: A 1% aqueous hyaluronic acid solution containing a water-soluble epoxy compound as a crosslinking agent is heated and concentrated to obtain an intermolecularly crosslinked hyaluronic acid. Subsequently, this crosslinked compound is freeze-dried under vacuum to obtain a hyaluronic acid sponge. The sponge is impregnated with an atherocollagen solution and then freeze-dried under vacuum. Thus, a substrate for tissue regeneration is obtained.

[続表有])

WO 02/45767 A1



LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

架橋剤である水溶性エポキシ化合物を添加した1%ヒアルロン酸水溶液を加温して濃縮し、ヒアルロン酸の分子間架橋物を得る。次いで、この分子間架橋物を真空凍結乾燥することにより、ヒアルロン酸スポンジを得る。このヒアルロン酸スポンジにアテロコラーゲン溶液を浸した後、真空凍結乾燥することにより、組織再生用基材を得る。

明細書

組織再生用基材、移植用材料及びそれらの製法

5 技術分野

本発明は、医療分野に広く利用可能な組織再生用基材、移植用材料及びそれらの製法に関する。

背景技術

- 10 近年、細胞を培養し、組織を再構築する再生組織工学が注目されている。この再生組織工学では、生体親和性の高い種々の材料で形成された組織再生用基材に各種細胞を保持させ、培養することで移植用材料を得ている。

- 例えば、線維芽細胞等を組み込んだ培養皮膚ではコラーゲンスポンジ
15 が組織再生用基材として利用できることが知られており（特開平4-332561号公報）、最近では、コラーゲンに代えてヒアルロン酸が利用可能であることも示唆されている（特開平11-319068号公報）。

- ヒアルロン酸は、二糖繰り返し構造を持つムコ多糖の一種であり、主
20 として動物の関節液や眼球硝子体、臍帯や真皮層などの結合組織などに存在する物質である。また、分子量のオーダーは数十万～数百万であり、非常に多量の水と結合する性質があり、これが例えば関節の低摩擦性や皮膚真皮組織の保水性に関連している。また、損傷を受けた結合組織が修復するとき、ヒアルロン酸の産生が一時的に活発になり、組織再構
25 築における細胞移動を促進する。このようなことから、ヒアルロン酸は創傷被覆材として優れた能力を発揮するものといえる。

しかしながら、ヒアルロン酸は創傷被覆材としては優れた能力を発揮するものの、含水性が非常に高いため、組織再生用基材として利用するには、細胞の接着性が低く、生体外（in vitro）での細胞培養が困難であるという問題があった。

- 5 本発明は上記問題点を解決することを課題とするものであり、ヒアルロン酸を主体とする組織再生用基材であって生体外での細胞培養と、移植後の組織再生に適したものを提供することを目的とする。また、この組織再生用基材の製法を提供することを別の目的とする。更に、この組織再生用基材を利用した移植用材料及びその製法を提供することを別の
- 10 目的とする。

発明の開示

上記課題を解決するため、本発明者は鋭意研究の結果、下記の第1～第4の発明を完成するに至った。

- 15 本発明の第1は、ヒアルロン酸及び／又はその誘導体を主体としたヒアルロン酸スポンジと、前記ヒアルロン酸スポンジの少なくとも片面に生体由来の高分子材料からなるスポンジを積層させた細胞接着部とを備えたことを特徴とする。この組織再生用基材の細胞接着部は、生体由来の高分子材料からなるスポンジを積層したものであるため、組織再生用
- 20 基材に組み込まれる細胞が良好に接着する。また、ヒアルロン酸及び／又はその誘導体を主体としたヒアルロン酸スポンジを備えているため、細胞増殖の促進等の創傷治癒能力にも優れている。したがって、この組織再生用基材によれば、生体外での細胞培養と、移植後の組織再生を良好に行うことができる。また、細胞を高密度で播種した場合、従来のコ
- 25 ラーゲンスポンジでは大きな収縮がみられるのに対して、本発明の組織再生用基材ではそのような収縮はほとんどみられない。この組織再生用

基材は、細胞を組み込んで移植用材料として使用してもよいが、それ以外に創傷面を被覆する創傷被覆材として使用してもよい。

ここで、ヒアルロン酸の誘導体としては、例えばヒアルロン酸ナトリウムやヒアルロン酸カリウム等のヒアルロン酸金属塩のほか、ヒアルロン酸のヒドロキシル基やカルボキシル基等がエーテル化、エステル化、アミド化、アセタール化、ケタール化されたもの等が挙げられ、中でも、ヒアルロン酸ナトリウムが好ましい。また、ヒアルロン酸スポンジとしては、分子間架橋されたもの（架橋ヒアルロン酸スポンジ）が好ましい。また、生体由来の高分子材料としては、例えばコラーゲン、ゼラチン、フィブリン、アルギン酸等が挙げられるが、このうちコラーゲン特に抗原性の少ないアテロコラーゲンが好ましく、また、コラーゲン、ゼラチンは分子間架橋されたものが好ましい。

この組織再生用基材は、ヒアルロン酸スポンジと細胞接着部との境界付近において、ヒアルロン酸スポンジに生体由来の高分子材料が入り込んだ状態になっていることが好ましい。この場合、ヒアルロン酸スポンジと細胞接着部との膨潤率に差があったとしても、含水時に両者が剥がれたりするおそれがない。

この組織再生用基材は、ヒアルロン酸スポンジが支持体としての織布、不織布又は編物に支持されていることが好ましい。この場合、支持体によって組織再生用基材の強度が増し、ピンセットで摘んで持ち上げた際にも欠損するおそれがなく、ハンドリングが良好になる。ここで、支持体の材質としては、ヒアルロン酸スポンジを補強する役割を果たすものであれば特に限定されないが、例えばナイロン、ポリエステル、シリコーンなどの合成高分子材や、絹、木綿、麻などの天然高分子材等が挙げられる。

本発明の第2は、このような組織再生用基材の製法であって、(1)

- 架橋剤を添加したヒアルロン酸及び／又はその誘導体の水溶液を濃縮することによりヒアルロン酸及び／又はその誘導体の分子間架橋物を得る架橋工程と、（２）前記分子間架橋物を真空凍結乾燥することによりヒアルロン酸スポンジを得るスポンジ化工程と、（３）前記ヒアルロン酸
- 5 スポンジの少なくとも片面から生体由来の高分子材料の水溶液を吸収させたあと真空凍結乾燥することにより前記細胞接着部を形成する積層工程とを含むことを特徴とする。この製法では、ヒアルロン酸及び／又はその誘導体の分子間架橋物を真空凍結乾燥することによりヒアルロン酸スポンジとした上で、その少なくとも片面から生体由来の高分子材料の
- 10 水溶液を吸収させたあと再度真空凍結乾燥を行う。この製法によれば、本発明の第１の組織再生用基材を比較的容易に作製できる。

- ここで、架橋工程において、架橋剤としては、例えば水溶性エポキシ化合物やグルタルアルデヒド等が挙げられるが、そのうち水溶性エポキシ化合物が好ましい。この水溶性エポキシ化合物としては、例えばエ
- 15 チレングリコールジグリシジルエーテル、グリセロールジグリシジルエーテル、グリセロールトリグリシジルエーテル等が挙げられる。架橋剤として水溶性エポキシ化合物を用いた場合、その使用量はヒアルロン酸及び／又はその誘導体に対して、重量比で概ね $1/2 \sim 1/10$ の割合であることが好ましく、特に $1/5 \sim 1/10$ 程度が好ましい。
- 20 この架橋工程においては、ヒアルロン酸及び／又はその誘導体の水溶液を用いるが、この水溶液におけるヒアルロン酸及び／又はその誘導体の濃度は、用いるヒアルロン酸及び／又はその誘導体の種類や分子量等にもよるが、概ね $0.5 \sim 1.5$ 重量％である。また、溶媒として用いる水としては、 $pH 5 \sim 6$ のイオン交換水が好ましい。
- 25 この架橋工程においては、架橋剤を添加したヒアルロン酸及び／又はその誘導体の水溶液を濃縮することによりヒアルロン酸及び／又はその

誘導体の分子間架橋反応を行うが、加温して行うのが好ましい。濃縮時の温度は、架橋剤として水溶性エポキシ化合物を用いた場合には、約 30～60℃が好ましく、約 40～60℃がより好ましく、約 50℃が特に好ましい。60℃を越えるような高い温度で加熱すると混合液に気泡
5 が生じて、得られるヒアルロン酸スポンジのスポンジ構造の均一性が十分でない場合がある。一方、30℃より低い温度では、分子間架橋反応速度が小さくなり、所望の濃度の分子間架橋物を得るのに長時間を要することがある。また、ヒアルロン酸及び／又はその誘導体の分子間架橋反応は、中性領域（pH 5～8）又は酸性領域（pH 3～5）で行うこ
10 とが好ましい。また、酸性領域で行うと、中性領域で行う場合に比べて濃縮時間が短くなる傾向にあるため、好ましい。

この架橋工程において、例えばヒアルロン酸及び／又はその誘導体の水溶液の濃度が 1～10 重量%、好ましくは 2～5 重量%、特に好ましくは約 5 重量%になった時点で濃縮を終えることが好ましい。濃縮を十
15 分行わなかった場合には、次のスポンジ化工程後に得られるヒアルロン酸スポンジの膨潤性を十分抑制できないことがあるため、好ましくない。即ち、ヒアルロン酸スポンジが高い膨潤性を有していると、例えば細胞培養時に液体培地等に浸した場合に必要以上に膨潤してしまい、その結果脆弱になると共に形状も大きくなるので、ハンドリングが困難にな
20 る。これに対して、上述のように濃縮の終点を制御すれば、ヒアルロン酸スポンジの膨潤性が十分抑制されるため、液体培地等に浸した場合に必要以上に膨潤することがなく、その結果脆弱になったり形状が大きくなりすぎることもないので、ハンドリングが容易になる。なお、濃縮液が完全にフィルム状になるまで架橋工程を行うと、真空凍結乾燥による
25 スポンジ化工程を行ったとしても、ヒアルロン酸スポンジは形成されないため、濃縮液がフィルム状になる前に濃縮の終点を設定する必要がある。

る。

次に、スポンジ化工程においては、架橋工程後の分子間架橋物を真空凍結乾燥することによりヒアルロン酸スポンジを得るが、真空凍結乾燥時の温度条件は、大きな氷の結晶を形成させないために、約 $-85^{\circ}\text{C} \sim -30^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 $-85^{\circ}\text{C} \sim -50^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは約 -85°C であり、真空条件は、 $30 \times 10^{-3} \sim 100 \times 10^{-3} \text{ mmbar}$ ($3 \sim 10 \text{ Pa}$) 程度が好ましく、より好ましくは $30 \times 10^{-3} \sim 50 \times 10^{-3} \text{ mmbar}$ ($3 \sim 5 \text{ Pa}$) である。

このスポンジ化工程においては、架橋工程で十分な濃縮を行えずに得られた分子間架橋物に対しては、凍結し解凍する操作を少なくとも1回以上行ったあと真空凍結乾燥することによりヒアルロン酸スポンジを得ることが好ましい。真空凍結乾燥前に凍結、解凍する操作を行わなかった場合には、含水時に形状を保持しにくいスポンジになることがあるのに対して、真空凍結乾燥前に凍結、解凍する操作を行った場合には、おそらく水素結合のような分子間相互作用が促進された結果と思われるが、含水時に形状を保持しやすいスポンジが得られる。このように真空凍結乾燥前に凍結、解凍する操作は複数回行ってもよいが、製造工程の簡素化を考慮すれば1回行うことが好ましい。また、真空凍結乾燥前に凍結、解凍する操作における凍結の温度条件は、約 $-85^{\circ}\text{C} \sim -30^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 $-85^{\circ}\text{C} \sim -50^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは約 -85°C であり、また、解凍の温度条件は約 $20^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 30°C 付近である。但し、解凍時に温度を多段階に分けて加温して解凍してもよい。この場合には、分子間架橋物が割れたりしないように注意する。なお、架橋工程において適切な濃縮条件で、十分な濃縮を行って得られた分子間架橋物に対しては、十分な強度を有しているので、真空凍結乾燥前の凍結／解凍操作を必ずしも行う必要はない。

次の積層工程に移る前に、スポンジ化工程で作製したヒアルロン酸スポンジを洗浄する水洗工程を設けることが好ましい。この水洗工程においては、未反応の架橋剤を不活性化させる不活性化剤を洗浄水中に添加しておいてもよい。例えば、架橋剤として水溶性エポキシ化合物を用いた場合には、不活性化剤としては、エポキシ基を開環させる機能を持ったもので生体に害を与えないものが好ましく、例えばグリシンが用いられる。

次に、積層工程においては、ヒアルロン酸スポンジの少なくとも片面から生体由来の高分子材料の水溶液を吸収させたあと真空凍結乾燥することにより細胞接着部を形成するが、生体由来の高分子材料としては既述の通り、コラーゲン、ゼラチン、フィブリン、アルギン酸等が挙げられ、このうちコラーゲン特に抗原性の少ないアテロコラーゲンが好ましい。また、生体由来の高分子材料の水溶液としては、0.2～1.0重量%の水溶液、好ましくは0.2～0.5重量%の水溶液、より好ましくは0.5重量%程度の水溶液を用いればよく、また、生体由来の高分子材料とヒアルロン酸との重量比は、1:2～10、好ましくは1:2～4、特に好ましくは1:4程度とすればよい。また、真空凍結乾燥の条件は、スポンジ化工程における真空凍結乾燥の条件と同様である。

また、この積層工程では、ヒアルロン酸スポンジの少なくとも片面から生体由来の高分子材料の水溶液を吸収させているため、得られた組織再生用基材のヒアルロン酸スポンジと細胞接着部との境界付近において、ヒアルロン酸スポンジに生体由来の高分子材料が入り込んだ状態になっている。このため、ヒアルロン酸スポンジと細胞接着部との膨潤率に差があったとしても、組織再生用基材を含水させた時に両者が剥がれたりするおそれがない。

この積層工程において、ヒアルロン酸スポンジの片面に複数の穴を開

け、その穴を開けた片面から生体由来の高分子材料の水溶液を吸収させたあと真空凍結乾燥することにより前記細胞接着部を形成してもよい。この場合、生体由来の高分子材料の水溶液は、ヒアルロン酸スポンジの有する多孔に浸透するのに加えて複数の穴にも入り込むため、ヒアルロン酸スポンジとの間にアンカーリングの効果も得られる。このようにして各穴や多孔に生体高分子材料の水溶液を浸透させた後真空凍結乾燥することにより、組織再生用基材におけるヒアルロン酸スポンジと細胞接着部との密着性を一層向上させることができる。なお、ここでいう「穴」には、例えば丸穴や角穴などのような一般的な穴のほか、例えば切れ目や凹凸などのように平面に比べて接触面積が大きくなるようなものも含まれる。

この積層工程において生体由来の高分子材料としてコラーゲン又はゼラチンを用いた場合には、積層工程後に紫外線ランプを照射してコラーゲン又はゼラチンを部分的に分子間架橋することにより含水時にコラーゲン又はゼラチンが流出することを防止するのが好ましく、更にその後エチレンオキシドガス等により滅菌するのが好ましい。また、前述の水洗工程を行わなかった場合は、未反応の架橋剤を不活性化させるために、不活性化剤を生体由来の高分子材料の水溶液に添加しておくのが好ましい。不活性化剤としては前述と同様に、例えば、架橋剤として水溶性エポキシ化合物を用いた場合には、グリシン等のエポキシ基を開環させる機能を持ったもので生体に害を与えないものが好ましい。

ところで、前述のスポンジ化工程及び積層工程の代わりに、以下のスポンジ化・積層工程を採用してもよい。即ち、架橋工程後の分子間架橋物を生体由来の高分子材料の水溶液と接触させたあと真空凍結乾燥することにより前記ヒアルロン酸スポンジと共に細胞接着部を形成する工程を採用してもよい。この場合、真空凍結乾燥を一度だけで済ませること

ができるので、製造プロセスが簡略化される。

- このスポンジ化・積層工程では、スポンジ化前の分子間架橋物に生体由来の高分子材料の水溶液を接触させるため、生体由来の高分子材料の水溶液がスポンジ化前の分子間架橋物に浸透しにくく、最終的に得られる組織再生用基材におけるヒアルロン酸スポンジと細胞接着部との密着性が十分でないおそれがある。そこで、ヒアルロン酸及び／又はその誘導体の分子間架橋物の上下方向に複数の穴を設け、生体由来の高分子材料の水溶液との接触面積を大きくしてアンカーリングの効果を得ることが好ましい。このようにして各穴に生体高分子材料の水溶液を浸透させたあとと真空凍結乾燥することにより、組織再生用基材におけるヒアルロン酸スポンジと細胞接着部との密着性を向上させることが好ましい。なお、ここでいう「穴」には、例えば丸穴や角穴などのような一般的な穴のほか、例えば切れ目や凹凸などのように平面に比べて接触面積が大きくなるようなものも含まれる。
- このスポンジ化・積層工程を採用してヒアルロン酸スポンジが支持体に支持された組織再生用基材を作製するには、例えば以下のような手順で行う。即ち、予め容器の底面に支持体を敷いておき、架橋剤を添加したヒアルロン酸及び／又はその誘導体の水溶液をこの容器内に入れる。その後、この水溶液を加温して濃縮することによりヒアルロン酸及び／又はその誘導体の分子間架橋物を作製する。その後、この容器内で分子間架橋物の上下方向に複数の穴を設け、生体由来の高分子材料の水溶液を加えて分子間架橋物と接触させ、真空凍結乾燥する。なお、必要に応じて、真空凍結乾燥前（例えば穴を設ける前あるいは穴を設けた後）に、分子間架橋物を凍結し解凍する操作を行ってもよい。このような操作を行うことにより、強度が向上し、含水時に形状を保持しやすいスポンジが得られる。

- 本発明の第3は、移植用材料であって、上述の組織再生用基材と、この組織再生用基材の細胞接着部に保持された細胞とを備えたことを特徴とする。この移植用材料は、細胞が細胞接着部に密着性よく保持されているため生体外で容易に細胞培養が可能であり、しかもヒアルロン酸の細胞移動の促進や保温効果による創傷治癒能力により組織が適切に再生される。ここで、細胞接着部に保持される細胞はどのような細胞であってもよいが、線維芽細胞、角化細胞、色素産生細胞、血管内皮細胞、内皮細胞、上皮細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、肝細胞、神経細胞、心筋細胞、ランゲルハンス島細胞等が挙げられる。例えば
- 10 他人由来の線維芽細胞を保持させた移植用材料を使用するには、皮膚創傷部にこの移植用材料を移植し、抗菌剤を含有する膜（例えばポリウレタン膜）で被覆し、更に包帯で被覆する。そのようにすると、他人由来の線維芽細胞から産生される各種サイトカインにより治癒が促進される。
- 15 本発明の第4は、このような移植用材料の製法であって、上述の組織再生用基材を作製したあと、この組織再生用基材の細胞接着部に細胞を組み込むことを特徴とする。この製法によれば、本発明の第3の移植用材料を比較的容易に作製できる。ここで、細胞接着部に細胞を組み込む方法としては、例えば、組織再生用基材を培養液に浸漬させると共に細胞を孔内へ取り込ませることにより保持する方法がある。
- 20

図面の簡単な説明

- 図1は実施例1の組織再生用基材の作製手順を表す説明図、図2は実施例2の組織再生用基材の作製手順を表す説明図、図3は実施例3の組織再生用基材の作製手順を表す説明図、図4は実施例4の組織再生用基材の作製手順を表す説明図である。
- 25

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の好適な実施例について説明する。本発明は、下記実施例に何ら限定されるものではない。なお、以下において「%」は特に

5 断りのない限り重量%を表す。

(実施例1)

[1] 組織再生用基材の作製 (図1 参照)

[1-1] ヒアルロン酸スポンジの作製

ヒアルロン酸ナトリウム (分子量約200万) 10gを蒸留水1Lに
10 溶解して1%ヒアルロン酸水溶液 (pH6) を作製した。ヒアルロン酸
の溶解はメカニカルスターラーで攪拌を行いながら十分な時間をかけて
行った。一方、水溶性エポキシ化合物として、デナコールEX313 (グ
リセロールジグリシジルエーテル; ナガセ化成工業) 1gを蒸留水2
0mlに希釈し、デナコールEX313溶液 (以下、EX313溶液と
15 いう) を作製した。このようにして作製したEX313溶液20mlを
、攪拌中のヒアルロン酸水溶液に添加し、さらに攪拌を30分程度行い
、ヒアルロン酸-EX313混合液を作製した。

得られたヒアルロン酸-EX313混合液を底面積が180cm² (10cm×18cm) のトレーに180ml注入した。このときのヒア
20 ルロン酸-EX313混合液の深さは、およそ1cmとなった。トレー
に注入されたヒアルロン酸-EX313混合液を室温で2時間静置し、
ヒアルロン酸-EX313混合液内の気泡を抜いた後、予めトレーの大き
さに応じて切断したベンリーゼ (不織布; 旭化成工業) をヒアルロン
酸-EX313混合液に上載した。

25 不織布を上載した状態のヒアルロン酸-EX313混合液を空気循環
型乾熱器に入れ、50℃で10時間静置した。これにより、ヒアルロン

酸の水酸基（ハイドロキシル基）やカルボキシル基とデナコール E X 3
1 3 のエポキシ基とが反応してヒアルロン酸の分子間架橋物が生成する
と共に、液量が約 2 / 5（つまりヒアルロン酸濃度として約 2 . 5 重量
%）になるまで濃縮した。このときの濃縮液の深さは、およそ 4 mm で
5 あった。

次に、この濃縮液を - 8 5 °C で凍結した。凍結時間は、フリーザの能力にも左右されるが、およそ 5 ~ 6 時間程度であり、完全に凍結させた。
この凍結後、室温に 1 ~ 1 . 5 時間放置して一度解凍し、解凍後、再び
5 ~ 6 時間程度、- 8 5 °C のフリーザで完全に凍結させた。そして、
10 $30 \times 10^{-4} \sim 50 \times 10^{-4}$ mm b a r（3 ~ 5 P a）にて真空凍結乾燥
処理を行うことにより、スポンジ構造を有するヒアルロン酸分子間架橋物
（以下、架橋ヒアルロン酸スポンジという）を得た。

[1 - 2] コラーゲンスポンジとの積層化

アテロコラーゲン 1 g を蒸留水 5 0 0 m l に溶解し、1 N H C l で
15 p H 4 に調整し、0 . 2 % アテロコラーゲン水溶液を作製した。作製した
アテロコラーゲン水溶液を底面積 1 8 0 c m² のトレーに 9 0 m l 注
入した。アテロコラーゲン水溶液は、もとのヒアルロン酸水溶液の液量
（1 8 0 m l）の半分の液量であり、コラーゲンとヒアルロン酸の重量
比は 1 : 1 0 となる。

20 前述のようにして作製した架橋ヒアルロン酸スポンジをアテロコラー
ゲン水溶液の入ったトレーにベンリーゼが上方に位置するように浸漬し
、1 時間放置することで架橋ヒアルロン酸スポンジにコラーゲン水溶液
をしみ込ませた。そして、このコラーゲン水溶液に浸漬させたヒアルロ
ン酸スポンジを - 8 5 °C で凍結後、真空乾燥した。

25 真空凍結乾燥後の架橋ヒアルロン酸スポンジにコラーゲンスポンジを
積層化したものを、コラーゲンスポンジ側に 1 5 W の紫外線ランプ（2

5 4 nm) を用いて 2.5 cm の距離から 30 分間照射することにより、コラーゲンの分子間架橋を行った。その後、滅菌バッグに詰め、EOG (エチレン・オキシド・ガス) 滅菌を 60℃、20 時間行った。これにより、組織再生用基材、つまり架橋コラーゲンスポンジ (細胞接着部
5) を備えた架橋ヒアルロン酸スポンジであってベンリレーゼ (支持体) に支持されたものを得た。

[2] 移植用材料の作製

組織再生用基材のベンリレーゼとは反対側の面に、10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ変法イーグル最小必須培地 (DMEM + 10
10 % FBS、ギブコ社製) 中に浮遊した培養ウサギ線維芽細胞を 5×10^4 細胞/cm² の密度で播種したのち、CO₂ 5%、37℃ のインキュベータ中で 7 日間培養し、移植用材料としての培養真皮を作製した。培地を除去し、これを凍結保存液 (10% DMSO 含有 DMEM + 20% FBS) に入れ、-152℃ の冷凍庫内で保存した。

15 [3] 移植試験

冷凍庫内に保存した培養真皮 (移植用材料) を使用時に解凍して凍結保存液を除去し、ハanks 液 30 ml で 2 回洗浄して動物実験に使用した。ウサギの背部に直径 7 cm の円を描き、全層皮膚を切除し、皮膚欠損創とした。この皮膚欠損創に先の培養真皮を適用し、創傷面の周辺を縫合し、その上にポリウレタンフィルム製創傷被覆材を適用し、更に滅
20 菌バットを載せて、創傷の周辺を縫合し、伸縮性包帯で圧迫固定した。その結果、良好な肉芽組織形成と創面積の顕著な減少が観察された。

(実施例 2)

[1] 組織再生用基材の作製 (図 2 参照)

25 [1-1] ヒアルロン酸スポンジの作製

実施例 1 と同様にして、ヒアルロン酸-EX 313 混合液を作製し、

得られたヒアルロン酸-E X 3 1 3 混合液を底面積が 180 cm^2 ($10\text{ cm} \times 18\text{ cm}$) のトレーに 180 ml 注入した。トレーにはその大きさに合わせて切断したベンリーゼ（前出）が予め載置されており、少量の蒸留水を加えて含水させてトレー底面に接着させておいた。トレー
5 に注入したヒアルロン酸-E X 3 1 3 混合液の深さは、およそ 1 cm となった。

この状態のヒアルロン酸-E X 3 1 3 混合液を空気循環型乾熱器に入れ、 50°C で 15 時間静置した。これにより、ヒアルロン酸の水酸基（
10 ハイドロキシル基）やカルボキシル基とデナコール E X 3 1 3 のエポキシ基とが反応してヒアルロン酸の分子間架橋物が生成すると共に、液量が約 $1/5$ （つまりヒアルロン酸濃度として約 5 重量%）になるまで濃縮された。このときの濃縮液の深さは、およそ $2 \sim 3\text{ mm}$ であった。

次に、この濃縮液を -85°C で凍結した。凍結時間は、フリーザの能力にも左右されるが、およそ $5 \sim 6$ 時間程度であり、完全に凍結させた
15 。そして、 $30 \times 10^{-3} \sim 50 \times 10^{-3}\text{ mmbar}$ ($3 \sim 5\text{ Pa}$) にて真空凍結乾燥処理を行うことにより、スポンジ構造を有するヒアルロン酸分子間架橋物（以下、架橋ヒアルロン酸スポンジという）を得た。その後、未反応の架橋剤を除去するため、 15 L のイオン交換水を入れた容器内に架橋ヒアルロン酸スポンジを一日浸漬させ、水洗した。

20 [1-2] コラーゲンスポンジとの積層化

アテロコラーゲン 2.5 g を蒸留水 500 ml に溶解し、 1 N HCl で $\text{pH } 3.2$ に調整し、 0.5% アテロコラーゲン水溶液を作製した。水洗した架橋ヒアルロン酸スポンジを、不織布を下側にして底面積 180 cm^2 のトレーに置き、この上に作製したアテロコラーゲン水溶液
25 を 90 ml 注入した。アテロコラーゲン水溶液は、もとのヒアルロン酸水溶液の液量（ 180 ml ）の半分の液量であり、コラーゲンとヒアル

ロン酸の重量比は1 : 4となる。

架橋ヒアルロン酸スポンジは周囲が若干収縮しており、トレーの側面との間に隙間が生じた。この隙間にアテロコラーゲン水溶液が浸入することにより、ヒアルロン酸スポンジの周囲を包み込むようにコラーゲン
5 が配置され、膨潤時に架橋ヒアルロン酸スポンジとコラーゲンスポンジとが分離するのを抑制した。

アテロコラーゲン水溶液を注入して一昼夜経過後、アテロコラーゲン水溶液を含んだヒアルロン酸スポンジを -85°C で真空凍結乾燥した。真空凍結乾燥後の架橋ヒアルロン酸スポンジにコラーゲンスポンジが積
10 層化したものを、コラーゲンスポンジ側に15 Wの紫外線ランプ(254 nm)を用いて25 cmの距離から30分間照射することにより、コラーゲンの分子間架橋を行った。その後、滅菌バッグに詰め、EOG滅菌を 60°C 、20時間行った。これにより、組織再生用基材、つまり架橋コラーゲンスポンジ(細胞接着部)を備えた架橋ヒアルロン酸スポン
15 ジであってベンリーゼ(支持体)に支持されたものを得た。

[2] 移植用材料の作製

上記方法により作製した 180 cm^2 の組織再生用基材を切断し、 90 cm^2 の大きさにした。切断した組織再生用基材を 180 cm^2 のトレーに入れ、DMEM+10%FBSを100 ml注入し、pHを調整し
20 た。pHを調整後(pH 7.4)、培養液を一度廃棄し、ヒト線維芽細胞懸濁液5 mlを組織再生用基材に 5×10^4 細胞/ cm^2 の密度で播種した。播種後、 37°C で一晩静置し、ヒト線維芽細胞を組織再生用基材に定着させた。その後、上記DMEM+10%FBS培地を100 ml加え、 37°C 、5% CO_2 下で1週間培養を行った。このように作製し
25 た培養真皮(移植用材料)は、十分な強度を有しているばかりでなく、周囲が2~3 mm程度収縮しているのみであるので、ハンドリングが良

好であり、欠損するおそれもないものだった。

(実施例 3)

[1] 組織再生用基材の作製 (図 3 参照)

[1-1] ヒアルロン酸スポンジの作製

- 5 ヒアルロン酸ナトリウム (分子量約 200 万) 20 g を蒸留水 2 L に溶解して 1% ヒアルロン酸水溶液 (pH 6) を作製した後、1 N HCl にて pH 3.5 に調整した。ヒアルロン酸の溶解はメカニカルスターラーで攪拌を行いながら十分な時間をかけて行った。一方、水溶性エポキシ化合物として、デナコール EX 810 (グリセロールジグリシジル
- 10 エーテル; ナガセ化成工業) 4 g を蒸留水 40 ml に希釈し、デナコール EX 810 溶液 (以下、EX 810 溶液という) を作製した。このようにして作製した EX 810 溶液 (40 ml) を、攪拌中のヒアルロン酸水溶液に添加し、さらに攪拌を 30 分程度行い、ヒアルロン酸-EX 810 混合液を作製した。
- 15 得られたヒアルロン酸-EX 810 混合液を底面積が 110 cm^2 ($10\text{ cm} \times 11\text{ cm}$) のトレーに 50 g 注入した。トレーにはその大きさに合わせて切断したベンリーゼ (前出) が予め載置されており、少量の蒸留水を加えて含水させてトレー底面に接着させておいた。トレーに注入したヒアルロン酸-EX 810 混合液の深さは、およそ 5 mm とな
- 20 った。
- この状態のヒアルロン酸-EX 810 混合液を空気循環型加熱器に入れ、50℃で 5 時間静置した。これにより、ヒアルロン酸の水酸基 (ハイドロキシル基) やカルボキシル基とデナコール EX 810 のエポキシ基とが反応してヒアルロン酸の分子間架橋物が生成すると共に、液量が
- 25 約 $1/2$ (つまりヒアルロン酸濃度として約 2 重量%) になるまで濃縮された。このときの濃縮液の深さは、およそ 2~3 mm であった、

次に、この濃縮液を -85°C で凍結した。凍結時間は、フリーザの能力にも左右されるが、およそ5～6時間程度であり、完全に凍結させた。そして、 $30 \times 10^{-3} \sim 50 \times 10^{-3} \text{ mmbar}$ ($3 \sim 5 \text{ Pa}$) にて真空凍結乾燥処理を行った。その後、未反応の架橋剤を除去するため、
5 1 Lの蒸留水を入れた容器内に架橋ヒアルロン酸スポンジを一晩浸漬させ、水洗した。

水洗後、再び -85°C のフリーザで完全に凍結させた。そして、 $30 \times 10^{-3} \sim 50 \times 10^{-3} \text{ mmbar}$ ($3 \sim 5 \text{ Pa}$) にて真空凍結乾燥処理を行うことにより、スポンジ構造を有するヒアルロン酸分子間架橋物

10 (以下、架橋ヒアルロン酸スポンジという)を得た。

[1-2] コラーゲンスポンジとの積層化

コラーゲンスポンジによる積層化に先立ち、剣山を使用して架橋ヒアルロン酸スポンジを穿孔した。このときの孔の間隔は、ほぼ4 mmであった。

15 アテロコラーゲン8 gを蒸留水1.6 Lに溶解し、1 N HClでpH 3.5に調整し、0.5%アテロコラーゲン水溶液を作製した。作製したアテロコラーゲン水溶液を底面積 110 cm^2 のトレーに40 g注入した。アテロコラーゲン水溶液は、もとのヒアルロン酸水溶液の液量(50 g)の約4/5の液量であり、コラーゲンとヒアルロン酸の重量
20 比は2:5となる。

前述のようにして作製した架橋ヒアルロン酸スポンジをアテロコラーゲン水溶液の注入したトレーにベンリゼが上方に位置するように浮かべ、1晩静置することで架橋ヒアルロン酸スポンジにコラーゲン水溶液をしみ込ませた。そして、コラーゲン水溶液をしみ込ませたヒアルロン

25 酸スポンジを -85°C で完全に凍結した後、真空凍結乾燥した。

真空凍結乾燥後の架橋ヒアルロン酸スポンジにコラーゲンスポンジを

- 積層化したものの両側に、各々15Wの紫外線ランプ(254nm)を用いて20cmの距離から30分間照射することにより、コラーゲンの分子間架橋を行った。その後、滅菌バッグに詰め、EOG(エチレン・オキサイド・ガス)滅菌を60℃、20時間行った。これにより、組織
- 5 再生用基材、つまり架橋コラーゲンスポンジ(細胞接着部)を備えた架橋ヒアルロン酸スポンジであって、ベンリーゼ(支持体)に支持されたものを得た。

[2] 移植用材料の作製

- 上記方法により作製した組織再生用基材をトレーに入れ、DMEM+
10 10%FBSを50ml注入し、pHを調整した。pHを調整後(pH7.4)、培養液を一度廃棄し、ヒト線維芽細胞懸濁液5mlを組織再生用基材に 1×10^5 細胞/cm²の密度で播種した。播種後、37℃で一晩静置し、ヒト線維芽細胞を組織再生用基材に定着させた。その後、上記DMEM+10%FBS培地を50ml加え、37℃、5%CO₂
- 15 下で1週間培養を行った。このように作製した培養真皮(移植用材料)は、培地を除去し、これを凍結保存液(10%DMSO含有DMEM+20%FBS)に入れ、-152℃の冷凍庫内で保存した。

[3] 移植試験

- 冷凍庫内に保存した培養真皮(移植用材料)を使用時に解凍して凍結
20 保存液を除去し、乳酸リンゲル液30~50mlで3回洗浄してヒト臨床適用した。創傷面は残存壊死組織を除去した後、消毒を行い、生理食塩水で十分に洗浄した。この皮膚欠損創に先の培養真皮を適用し、培養真皮の周囲を縫合固定した。その上に抗生剤含有軟膏を塗り込ませたガーゼを適用し、さらに滅菌ガーゼを載せて、創傷の周辺を縫合し、伸縮
- 25 性包帯で圧迫固定した。その結果、良好な肉芽組織形成と創面積の顕著な減少、創周囲からの上皮化が観察された。

(実施例 4)

[1] 組織再生用基材の作製 (図 4 参照)

[1-1] ヒアルロン酸スポンジの作製

ヒアルロン酸ナトリウム (分子量約 200 万) 2 g を蒸留水 200 m
5 L に溶解して 1% ヒアルロン酸水溶液 (pH 6) を作製した後、1 N
HCl にて pH 3.5 に調整した。ヒアルロン酸の溶解はメカニカルス
ターラーで攪拌を行いながら十分な時間をかけて行った。一方、水溶性
エポキシ化合物として、デナコール EX 810 0.2 g を蒸留水 2 m
l に希釈し、デナコール EX 810 溶液 (以下、EX 810 溶液という
10) を作製した。このようにして作製した EX 810 溶液 (2 ml) を、
攪拌中のヒアルロン酸水溶液に添加し、さらに攪拌を 30 分程度行い、
ヒアルロン酸-EX 810 混合液を作製した。

得られたヒアルロン酸-EX 810 混合液を底面積が $\phi 35$ mm ディ
ッシュに 4.8 g 注入した。ディッシュに注入したヒアルロン酸-EX
15 810 混合液の深さは、およそ 5 mm となった。

この状態のヒアルロン酸-EX 810 混合液を空気循環型加熱器に入
れ、50℃で 5 時間静置した。これにより、ヒアルロン酸の水酸基 (ハ
イドロキシル基) やカルボキシル基とデナコール EX 810 のエポキシ
基とが反応してヒアルロン酸の分子間架橋物が生成すると共に、液量
20 約 1/2 (つまりヒアルロン酸濃度として約 2 重量%) になるまで濃縮
された。このときの濃縮液の深さは、およそ 2~3 mm であった。

次に、この濃縮液を -85℃で凍結した。凍結時間は、フリーザの能
力にも左右されるが、およそ 5~6 時間程度であり、完全に凍結させ
た。そして、 $3.0 \times 10^{-3} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ mmbar (3~5 Pa) にて
25 真空凍結乾燥処理を行った。その後、未反応の架橋剤を除去するため、
1 L の蒸留水を入れた容器内に一晚浸漬させ、水洗した。水洗後、再び

− 8 5 °C のフリーザで完全に凍結させた。そして、 $30 \times 10^{-3} \sim 50 \times 10^{-3} \text{ mmbar}$ (3 ~ 5 Pa) にて真空凍結乾燥処理を行うことにより、スポンジ構造を有するヒアルロン酸分子間架橋物（以下、架橋ヒアルロン酸スポンジという）を得た。

5 [1 - 2] コラーゲンスポンジとの積層化

コラーゲンスポンジによる積層化に先立ち、剣山を使用して架橋ヒアルロン酸スポンジを穿孔した。このときの孔の間隔は、ほぼ 4 mm であった。

- 一方、0. 5 % コラーゲン水溶液 (KOKENCELLGEN I -
10 PC : 株式会社高研製) を $\phi 35 \text{ mm}$ ディッシュに 3. 8 g 注入した。コラーゲン水溶液は、もとのヒアルロン酸水溶液の液量 (4. 8 g) の約 4 / 5 の液量であり、コラーゲンとヒアルロン酸の重量比はおよそ 2 : 5 となる。

- 前述のようにして作製した架橋ヒアルロン酸スポンジのうち穿孔した
15 面が下になるようにコラーゲン水溶液の注入したディッシュに浮かべ、一晩静置することで架橋ヒアルロン酸スポンジにコラーゲン水溶液をしみ込ませた。そして、コラーゲン水溶液をしみ込ませたヒアルロン酸スポンジを − 8 5 °C で完全に凍結した後、真空凍結乾燥した。

- 真空凍結乾燥後の架橋ヒアルロン酸スポンジにコラーゲンスポンジを
20 積層化したものの両側に、各々 15 W の紫外線ランプ (254 nm) を用いて 20 cm の距離から 30 分間照射することにより、コラーゲンの分子間架橋を行った。その後、滅菌バッグに詰め、EOG 滅菌を 60 °C、20 時間行った。これにより、組織再生用基材、つまり架橋コラーゲンスポンジ (細胞接着部) を備えた架橋ヒアルロン酸スポンジを得た。
25 この組織再生用基材には、ベンリーゼによる強度付加はなされていないが、ピンセット等による取扱いは容易に行うことができた。

- 本実施例の組織再生用基材は、実施例 1～3 と同様、培養真皮として利用することができるほか、創傷被覆材として用いることもできる。創傷被覆材として用いる場合には、生体吸収性を有しているため除去が不要であるし、コラーゲン側を創傷面に当てることによりコラーゲンの細胞保持効果が得られ、創傷適用後にヒアルロン酸が創傷面に溶出して細胞遊走性を発揮し治癒促進効果が得られることが期待される。

- なお、実施例 2 の別例として、ヒアルロン酸－E X 3 1 3 混合液の分子間架橋反応後、真空凍結乾燥することなく架橋反応物の上下方向に穴を開け、その穴を開けた面とアテロコラーゲン水溶液とを接触させたあと真空凍結乾燥することにより、ヒアルロン酸スポンジにすると同時にコラーゲンスポンジにすることもできる。この場合、製造プロセスが簡略化されるし、両スポンジは穴の存在によりアンカーリングの効果が得られるので良好に密着する。

15 産業上の利用の可能性

本発明は、ヒアルロン酸を主体とする組織再生用基材であって生体外での細胞培養と移植後の組織再生に適しているため、医療分野に広く利用可能である。

請求の範囲

1. ヒアルロン酸及び／又はその誘導体を主体としたヒアルロン酸スポンジと、
前記ヒアルロン酸スポンジの少なくとも片面に生体由来の高分子材料
- 5 からなるスポンジを積層させた細胞接着部と
を備えたことを特徴とする組織再生用基材。
2. 請求項1記載の組織再生用基材であって、
前記生体由来の高分子材料はコラーゲン、ゼラチン、フィブリン又はアルギン酸であることを特徴とする組織再生用基材。
- 10 3. 請求項1又は2記載の組織再生用基材であって、
前記ヒアルロン酸スポンジ及び前記細胞接着部はいずれも分子間架橋されていることを特徴とする組織再生用基材。
4. 請求項1～3のいずれかに記載の組織再生用基材であって、
前記ヒアルロン酸スポンジと前記細胞接着部との境界付近は、ヒアル
- 15 ロン酸スポンジに生体由来の高分子材料が入り込んだ状態であることを特徴とする組織再生用基材。
5. 請求項1～4のいずれかに記載の組織再生用基材であって、
前記ヒアルロン酸スポンジは、支持体としての織布、不織布又は編物を支持されていることを特徴とする組織再生用基材。
- 20 6. 請求項1～4のいずれかに記載の組織再生用基材を製造する方法であって、
(1) 架橋剤を添加したヒアルロン酸及び／又はその誘導体の水溶液を濃縮することによりヒアルロン酸及び／又はその誘導体の分子間架橋物を得る架橋工程と、
- 25 (2) 前記分子間架橋物を真空凍結乾燥することによりヒアルロン酸スポンジを得るスポンジ化工程と、

(3) 前記ヒアルロン酸スポンジの少なくとも片面から生体由来の高分子材料の水溶液を吸収させたあと真空凍結乾燥することにより前記細胞接着部を形成する積層工程と

を含むことを特徴とする組織再生用基材の製法。

- 5 7. 請求項5記載の組織再生用基材を製造する方法であって、

(1) 架橋剤を添加したヒアルロン酸及び／又はその誘導体の水溶液を織布、不織布又は繩物と接触させた状態で濃縮することによりヒアルロン酸及び／又はその誘導体の分子間架橋物を得る架橋工程と、

- 10 (2) 前記分子間架橋物を真空凍結乾燥することによりヒアルロン酸スポンジを得るスポンジ化工程と、

(3) 前記ヒアルロン酸スポンジの少なくとも片面から生体由来の高分子材料の水溶液を吸収させたあと真空凍結乾燥することにより前記細胞接着部を形成する積層工程と

を含むことを特徴とする組織再生用基材の製法。

- 15 8. 請求項6又は7記載の製法であって、

前記架橋工程において、ヒアルロン酸及び／又はその誘導体の濃度が1～10重量%となった時点を濃縮の終点としたことを特徴とする組織再生用基材の製法。

9. 請求項6～8のいずれかに記載の製法であって、

- 20 前記スポンジ化工程において、前記分子間架橋物を凍結し解凍する操作を少なくとも1回以上行ったあと真空凍結乾燥することによりヒアルロン酸スポンジを得ることを特徴とする組織再生用基材の製法。

10. 請求項6～9のいずれかに記載の製法であって、

- 25 前記積層工程において、前記ヒアルロン酸スポンジの片面に複数の穴を開け、その穴を開けた片面から生体由来の高分子材料の水溶液を吸収させたあと真空凍結乾燥することにより前記細胞接着部を形成すること

を特徴とする組織再生用基材の製法。

1 1. 請求項 6～8 のいずれかに記載の製法であって、

前記スポンジ化工程及び前記積層工程の代わりに、

前記架橋工程後の分子間架橋物を生体由来の高分子材料の水溶液と接

- 5 触させたあと真空凍結乾燥することにより前記ヒアルロン酸スポンジと該高分子材料からなる前記細胞接着部とを形成するスポンジ化・積層工程

を含むことを特徴とする組織再生用基材の製法。

1 2. 請求項 1 1 記載の製法であって、

- 10 前記スポンジ化・積層工程において、前記架橋工程後の分子間架橋物の上下方向に複数の穴を設ける工程と、生体由来の高分子材料の水溶液と接触させてこの水溶液を前記穴に浸透させる工程と、真空凍結乾燥することにより前記ヒアルロン酸スポンジと該高分子材料からなる前記細胞接着部とを形成する工程とを有することを特徴とする組織再生用基材
- 15 の製法。

1 3. 請求項 1 1 又は 1 2 記載の製法であって、

前記スポンジ化・積層工程において、前記架橋工程後の分子間架橋物を凍結し解凍する操作を少なくとも 1 回以上行ったあと真空凍結乾燥することを特徴とする組織再生用基材の製法。

- 20 1 4. 請求項 6～1 3 のいずれかに記載の製法であって、

さらに前記細胞接着部を分子間架橋する接着部架橋工程を有することを特徴とする組織再生用基材の製法。

1 5. 請求項 1～5 のいずれかに記載の組織再生用基材又は請求項 6～

1 4 のいずれかに記載の製法によって作製された組織再生用基材と、

- 25 前記組織再生用基材の細胞接着部に保持された細胞とを備えたことを特徴とする移植用材料。

16. 請求項15記載の移植用材料であって、

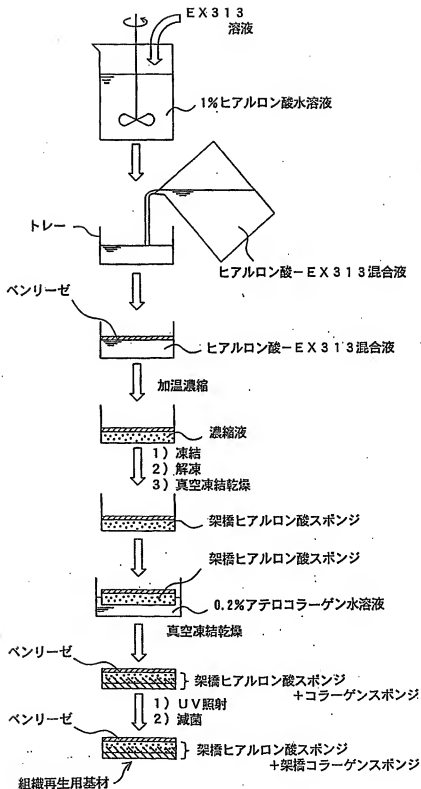
前記細胞は、線維芽細胞、角化細胞、色素産生細胞、血管内皮細胞、内皮細胞、上皮細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、肝細胞、神経細胞、心筋細胞又はランゲルハンス島細胞である移植用材料。

5 17. 請求項15又は16記載の移植用材料を製造する方法であって、

請求項6～14のいずれかに記載の組織再生用基材の製法によって組織再生用基材を作製したあと、この組織再生用基材の細胞接着部に細胞を組み込むことを特徴とする移植用材料の製法。

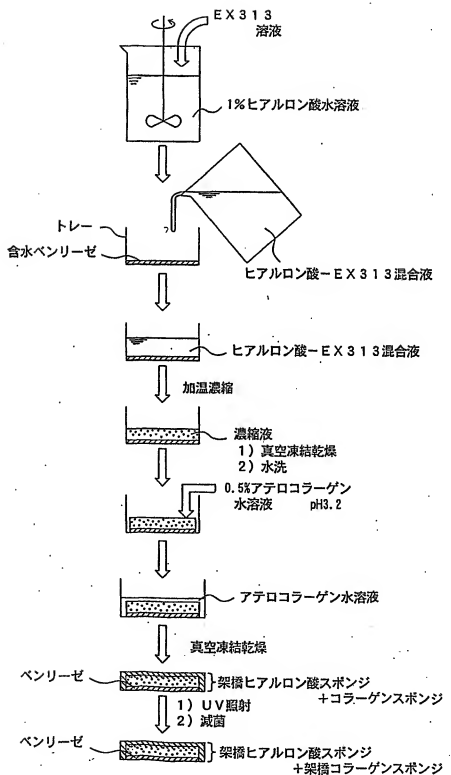
1 / 4

図 1



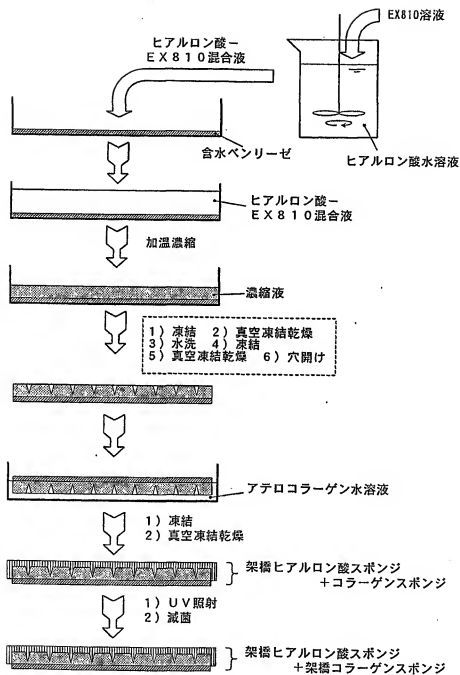
2 / 4

図 2



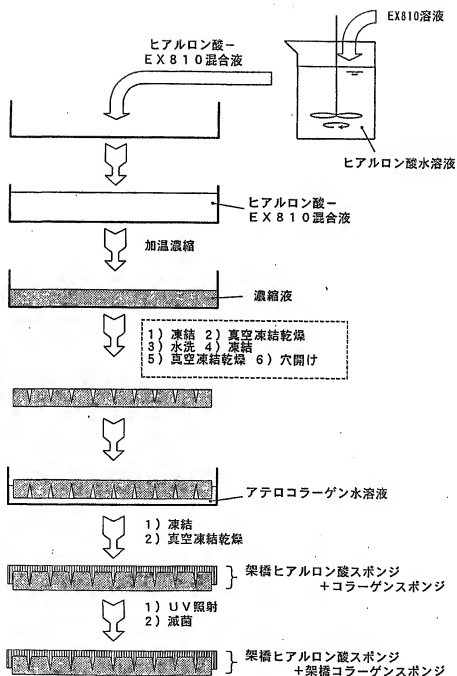
3 / 4

図 3



4 / 4

図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ A61L27/44, 27/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61L15/00-33/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1926-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2002 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2002 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2002 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPI/L (QUESTEL)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P, X | JP 2001-212224 A (Toyobo Co., Ltd.), 07 August, 2001 (07.08.2001), Claim 1 (Family: none) | 1-5 |
| X | WO 94/17840 A1 (Fidia Advanced Biopolymers S.R.L.), 18 August, 1994 (18.08.1994), Claim 15 | 1 2-17 |
| Y | & AU 9460014 A & EP 682534 A & JP 08-506497 A | |
| X | EP 1022031 A1 (Nissho Corporation), 21 January, 2000 (21.01.2000), Claims 1 to 3; Par. No. [0065] & JP 2000-210376 A & JP 2000-271207 A | 1-5 |
| Y | JP 11-319066 A (Mitsubishi Chemical Corporation), 24 November, 1999 (24.11.1999), entire description (Family: none) | 3-14 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 February, 2002 (21.02.02)Date of mailing of the international search report
05 March, 2002 (05.03.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10751

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | JP 06-292716 A (Yoshihiko SHIMIZU), 21 October, 1994 (21.10.1994), Claim 1; columns 2, 7, 8, etc. (Family: none) | 2, 15-17 |
| Y | JP 2000-237294 A (Denki Kagaku Kogyo K.K.), 05 September, 2000 (05.09.2000), Par. Nos. [0009], [0015] (Family: none) | 9, 13 |
| Y | JP 04-332561 A (Koken Co., Ltd., et al.), 19 November, 1992 (19.11.1992), Claim 1; Par. Nos. [0009], [0010], etc. (Family: none) | 10, 12, 15-17 |
| A | EP 403650 A1 (Terumo Kabushiki Kaisha), 27 December, 1990 (27.12.1990), Claim 1, etc. & WO 89/08465 A & AU 8932125 A & AU 8932126 A & JP 02-034165 A & JP 02-034171 A & JP 02-071748 A & EP 411124 B1 & DE 68909933 E & US 5263983 A & DE 68915540 E & US 5350583 A & JP 2610471 B2 & JP 2645098 B2 | 2 |
| A | JP 11-322807 A (Mitsubishi Chemical Corporation), 26 November, 1999 (26.11.1999), entire description (Family: none) | 3-14 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61L27/44, 27/38

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61L15/00-33/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2002年
 日本国実用新案登録公報 1996-2002年
 日本国登録実用新案公報 1994-2002年

国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN),
WPI/L (QUESTEL)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリ* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|----------------|--|------------------|
| P, X | JP 2001-212224 A (東洋紡績株式会社) 2001.08.07, 請求項1参照 (ファミリーなし) | 1-5 |
| X Y | WO 94/17840 A1 (FDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.R.L.) 1994.08.18, Claim15参照 & AU 9460014 A & EP 682534 A & JP 08-506497 A | 1 2-17 |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日目の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 02. 02

国際調査報告の発送日

05.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

人原 由美子



4C 3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | EP 1022031 A1 (Nissho Corporation) 2000.01.21 Claim1-3, [0065]参照 & JP 2000-210376 A & JP 2000-271207 A | 1-5 |
| Y | JP 11-319066 A (三菱化学株式会社) 1999.11.24, 明細書全体参照 (ファミリーなし) | 3-14 |
| Y | JP 06-292716 A (清水 慶彦) 1994.10.21, 請求項1、第2,7,8欄等参照 (ファミリーなし) | 2, 15-17 |
| Y | JP 2000-237294 A (電気化学工業株式会社) 2000.09.05, 【0009】、【0015】段落参照 (ファミリーなし) | 9, 13 |
| Y | JP 04-332561 A (株式会社高研、他2名) 1992.11.19, 請求項1、【0009】、【0010】等参照 (ファミリーなし) | 10, 12, 15-17 |
| A | EP 403650 A1 (Terumo Kabusiki Kaisha) 1990.12.27, Claim1等参照 & WO 89/08465 A & AU 8932125 A & AU 8932126 A & JP 02-034165 A & JP 02-034171 A & JP 02-071748 A & EP 411124 B1 & DE 68909933 E & US 5263983 A & DE 68915540 E & US 5350583 A & JP 2610471 B2 & JP 2645098 B2 | 2 |
| A | JP 11-322807 A (三菱化学株式会社) 1999.11.26, 明細書全体参照 (ファミリーなし) | 3-14 |